



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS FENOTIPOS
DE NEUTRÓFILOS N1 Y N2 EN LESIONES PERIODONTALES.**

FRANCISCA ANDREA ALEGRIA REYES

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Jaime Diaz Zuñiga

ASESOR EXTERNO

Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2024/02.
Santiago – Chile
2024**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS FENOTIPOS
DE NEUTRÓFILOS N1 Y N2 EN LESIONES PERIODONTALES.**

FRANCISCA ANDREA ALEGRIA REYES

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Jaime Diaz Zuñiga

ASESOR EXTERNO

Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2024/02.
Santiago – Chile
2024**

Dedicatoria

A Dios, que sin su ayuda y mi fe esta travesía jamás se hubiera concretado.

A mi mamá Soledad que ha sido mi pilar y compañía, quien ha estado en las alegrías y en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi abuela “lela” Elizabeth que al igual que mi mamá ha sido el apoyo y el pilar en el cual me he apoyado todos estos años.

A mi papá Cristian y mis hermanos quienes con su cariño y apoyo incondicional jamás habría logrado mi objetivo.

A la memoria de mi abuelo “tata” Miguel quien ya no está junto a mí, pero quien me ayudó a terminar mi carrera, a pesar de querer rendirme muchas veces.

A mi novio Cesar quien me apoyo en las situaciones difíciles, se transformó en mi familia y siempre me brindo su ánimo cuando más lo necesite.

A mis amigos y familia quienes desde mi primer año hicieron que esta travesía fuera más amena y divertida, se los agradeceré siempre.

A mis queridas mascotas, que a pesar de que ellos no expresen sus sentimientos, sin ellos esto hubiera sido muy difícil de afrontar.

Agradecimiento

Deseo dejar mi agradecimiento a mi familia quienes estuvieron siempre, apoyándome cuando más lo necesite, preguntándome ¿cómo va la tesis?, me dieron ese impulso y quisieron lo mejor para mí en esta trayectoria.

Mi agradecimiento más grande va hacia mi mamá, es la amiga que siempre quise tener en la vida, me ha formado como persona, siempre queriendo que sea mejor, ella es y siempre será el pilar más grande de mi vida.

A mi abuelo “tata”, él fue como mi papá, mi gran amigo y confidente, siempre queriendo que fuera una profesional, dándome los mejores consejos, me decía “¿cuándo me vas atender?, necesito unas prótesis nuevas, yo quiero ser tu primer paciente” pero la vida muchas veces tiene otros planes, dejó una marca en mí, la más difícil de superar, sin embargo, gracias a él lo logre y no renuncié.

A mi tutor el Dr. Jaime Diaz, quien me enseñó a realizar un buen trabajo de investigación y tuvo la paciencia de explicarme los conceptos que no entendía.

A todo mi más sincero agradecimiento por el ánimo, apoyo y fortaleza que me dieron siempre.

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	2
<i>II.1 Respuesta pro-inflamatoria mediada por Neutrófilos</i>	2
<i>II.2 Planteamiento del problema</i>	3
III. Hipótesis	5
IV.1 Objetivo general	5
<i>IV.2 Objetivos específicos</i>	5
V. Materiales y Métodos	6
<i>V.1 Diseño de estudio</i>	6
<i>V.2 Población de estudio</i>	6
<i>V.3 Examen y diagnóstico periodontal</i>	6
<i>V.4 Toma de muestras biológicas</i>	7
<i>V.5 Purificación del RNA total</i>	7
<i>V.6 Detección de neutrófilos N1 y N2 mediante inmunofluorescencia</i>	9
<i>V.7 Análisis estadístico</i>	9
VI. Resultados	10
<i>VI.1 Datos epidemiológicos</i>	10
<i>VI.2 Cuantificación de los marcadores de neutrófilos N1 mediante PCR</i>	11
<i>VI.3 Cuantificación de los marcadores de neutrófilos N2 mediante PCR</i>	12
<i>VI.4 Inmunodetección de neutrófilos N1 y N2</i>	13
VII. Discusión	14
VIII. Conclusión	18
IX. Referencias	19
X. Anexo	23

I. Resumen

Introducción: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible inducida por una microbiota subgingival disbiótica que compromete los tejidos de soporte. Una de las células inmunitarias que constituyen la principal línea de defensa del sistema inmune son los neutrófilos, los cuales poseen distintas funciones.

Se han descrito dos fenotipos, N1 y N2, sin embargo, en el desarrollo de la periodontitis, no ha sido definido su papel.

Metodología: Este estudio observacional, analítico y transversal, incluyó un total de 50 personas, dentro de las cuales 38 son afectadas de periodontitis y 12 son sujetos sanos. Se realizaron biopsias de tejido gingival en cada paciente y las muestras fueron sumergidas en RNA safer para preservar el RNA total, ó en formalina 10%, con el fin de realizar el análisis histológico.

En las muestras se realizó la purificación del RNA total de las moléculas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12^a, TNF- α , TGF- β 1, CCL3, CCL5, Arg1, CD206, y Ym1, donde se analizaron a partir de 50 ng de cDNA mediante qPCR utilizando partidores específicos. A la vez, las muestras se sumergieron en formalina al 10% v/v, los cortes de 10 μ m se analizaron mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos primarios anti-Ly6G y anti- CD206, seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón o conejo. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-value <0,05.

Resultados: En los pacientes afectados por periodontitis, se detectó un incremento de los niveles de expresión de los mediadores pro-inflamatorios CCL3, CCL5, IL-6, IL-12A y TNF- α asociados al fenotipo N1. Por otro lado, los mediadores inmunomoduladores Arg1, CD206, IL-10, TGF- β 1, Ym1 están asociados al fenotipo N2. Se evaluó la presencia de neutrófilos N1 (Ly6G⁺ CD206⁻) o N2 (Ly6G⁻ CD206⁺) mediante inmunofluorescencia. En los pacientes afectados por periodontitis se detectó la presencia de neutrófilos N1 y la ausencia de N2 y en las biopsias de personas sanas no hubo detección de estos fenotipos.

Conclusión: Las personas afectadas por periodontitis presentan mayores niveles de marcadores asociados a los fenotipos N1, lo que sugiere una mayor frecuencia de detección en comparación con los sujetos sanos.

II. Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible inducida por una microbiota subgingival disbiótica (Hajishengallis, 2014) que se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte alrededor de los dientes: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (Könönen y cols., 2019). La disbiosis de la microbiota es necesaria para la periodontitis debido a que es la respuesta inmune inducida ante ciertas bacterias es la principal causa de la destrucción de los tejidos. En efecto, ciertas bacterias son capaces de generar el incremento de mediadores pro-inflamatorios en los tejidos del hospedero dando como resultado su inflamación y destrucción. Entre las bacterias que generan la disbiosis, se encuentran los patobiontes y bacterias clave (del inglés *keystone*) *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Filifactor alocis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, las que se asocian al inicio y progresión de la periodontitis (Könönen y cols., 2019). Desde que nos colonizan a edades tempranas, estas bacterias residen en la microbiota subgingival, donde pueden ser reconocidas por los neutrófilos, que constituyen una de las principales líneas de defensa del sistema inmune (Hajishengallis y Hajishengallis, 2014).

II.1 Respuesta pro-inflamatoria mediada por Neutrófilos

Los neutrófilos son parte de la respuesta inmune primaria, corresponden a células que constituyen la primera línea de defensa y protegen al hospedero de la invasión bacteriana (Wang y cols., 2018). Para ello, los neutrófilos poseen las funciones de quimiotaxis, migración, diapédesis, fagocitosis, degranulación, oxidación y, finalmente, la muerte por liberación de la trampa extracelular de neutrófilos (del inglés *Neutrophil Extracellular Trap*, NET) o NETosis (Wang y cols., 2018). En efecto, en los tejidos periodontales, las bacterias son reconocidas por las células del epitelio de unión que son capaces de producir Interleuquina (IL)-8, citoquina que mediante un gradiente de concentración induce la atracción de los neutrófilos circulantes hacia el tejido conectivo subyacente. Una vez en el tejido conectivo, los neutrófilos pueden fagocitar las bacterias presentes o bien, migrar por el espesor del epitelio de unión hacia el surco gingivo-dentario y fagocitar las bacterias que se encuentran en la microbiota. Como consecuencia de una microbiota disbiótica, los neutrófilos incrementan su capacidad fagocítica y oxidativa, caracterizada por un

incremento en la producción de IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (IFN)- γ , y de especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*, ROS) o nitrógeno (del inglés *Reactive Nitrogen Species*, RNS) (Dutzan y cols., 2016; Rudin y cols., 2020). En caso que la virulencia bacteriana sea mayor, los neutrófilos liberan sus gránulos citoplasmáticos, conocido como degranulación, que contienen enzimas proteolíticas, citoquinas, quimioquinas, entre otras, que son capaces de destruir una gran cantidad de bacterias y componentes del tejido conectivo y atraer a otros fagocitos, como los macrófagos o células dendríticas (Rudin y cols, 2020). Finalmente, los neutrófilos pueden inducir su muerte por NETosis, donde liberan su DNA, histonas, enzimas proteolíticas y mediadores pro-inflamatorios que formarán una red tridimensional con el objetivo de contener la invasión bacteriana y facilitar su fagocitosis por los macrófagos (Rudin y cols., 2020). Aunque los neutrófilos son necesarios para el re-establecimiento de la homeodinamia y un periodonto sano, el reclutamiento crónico de un número excesivo de neutrófilos en los tejidos periodontales y su desregulación fenotípica puede causar daño tisular colateral (Hajishengallis, 2014a y 2014b). Convencionalmente, los neutrófilos son reconocidos como fagocitos, generadores del ambiente necesario para facilitar la eliminación de bacterias de los sitios afectados y para reclutar células más especializadas que desencadenen respuestas más específicas. Sin embargo, la amplia variación en la cantidad de neutrófilos en los tejidos periodontales durante la salud o enfermedad, el que varía del 0 al 100% del infiltrado leucocitario, sugiere que dependiendo del estado inflamatorio o la presencia de una bacteria específica, los neutrófilos podrían diferenciarse hacia subconjuntos que ayuden al mantenimiento de la homeodinamia o la generación de una disbiosis (Matsuo y cols., 2000; Taniguchi y cols., 2002; Rosales, 2018).

II.2 Planteamiento del problema

Recientemente, en otras patologías como las tumorales se han descrito 2 fenotipos de neutrófilos, con funciones divergentes entre sí: los neutrófilos asociados a tumores pro-inflamatorios o TAN1 y los moduladores o TAN2. Los TAN1 tienen actividad anti-tumoral, debido a la liberación de citoquinas pro- inflamatorias como IL-12, TNF- α , CCL3, CXCL9, CXCL10, y está caracterizado por tener mayor adhesión, transmigración, fagocitosis, explosión oxidativa y degranulación, y los

TAN2 tienen actividad pro-tumoral e inmuno-supresora, caracterizado por la promoción de la angiogénesis tumoral, la invasión, y la metástasis mediante la producción de HGF, Oncostatina M, ROS, RNS, metaloproteínasa de matriz (del inglés *Matrix Metalloproteinases*, MMP) y elastasa de neutrófilos (NE) (Wang y cols., 2018).

Los neutrófilos están ligados a la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, en particular, durante una isquemia, los neutrófilos incrementan sus funciones. En efecto, durante la isquemia coronaria se produce un aumento en la producción de NET, mayor producción de proteasas y mayores interacciones con plaquetas, con el objetivo de inducir la reparación tanto del miocardio como del cerebro (Carbone y cols., 2020). Después de un episodio isquémico se provoca una respuesta inflamatoria, donde la liberación de quimioquinas atrae a los neutrófilos hacia el sitio donde fue provocado el accidente cerebrovascular (ACV). En efecto, la polarización de los neutrófilos hacia un fenotipo N2 tiene una función protectora, limitando la extensión de la lesión (Cai y cols., 2019). Por otra parte, al someter cultivos de neuronas a condiciones hipóxicas e hipoglicémicas en presencia de neutrófilos, los resultados demuestran que neutrófilos N1 exacerbaban la muerte neuronal, y la presencia de los fenotipos N2 protegen a las neuronas (Cai y cols., 2019). De esta manera y muy similar a lo descrito en lesiones tumorales, los fenotipos N1 y N2 se definen en base a su función y morfología. Así, los neutrófilos N1 expresan CD177, Ly6G, CD208, poseen una mayor capacidad oxidativa, mayor liberación de gránulos, mayor producción de citoquinas pro- inflamatorias, mayor capacidad de migración y fagocitosis y mayor NETosis. Por el contrario, los fenotipos N2 expresan CD11b, CD16b, CD62L, CD66 y CD177 en bajas concentraciones, poseen menor capacidad oxidativa, menor liberación de gránulos, mayor producción de mediadores inmuno-moduladores, menor capacidad de migración y fagocitosis y menor NETosis (Ohms y cols., 2020). Si bien a la fecha se identifica la presencia de distintas funciones de neutrófilos en los tejidos periodontales afectados de periodontitis, aún no se identifica si los fenotipos N1 o N2 cumplen algún rol durante el desarrollo de la periodontitis.

III. Hipótesis

En biopsias de tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis se detecta una mayor presencia de neutrófilos N1 y menor presencia de neutrófilos N2, en comparación con biopsias de tejidos periodontales de sujetos sanos. Por el contrario, en biopsias de tejidos periodontales de sujetos sanos se detecta una mayor presencia de neutrófilos N2 y una menor de neutrófilos N1.

IV.1 Objetivo general

Caracterizar la presencia de los fenotipos de neutrófilos N1 y N2 en biopsias de tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis.

IV.2 Objetivos específicos:

1. Cuantificar los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12^a, TNF- α , TGF- β 1, CCL3, CCL5, Arg1, Ym1 y CD206 en biopsias de tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis.
2. Determinar la presencia de células Ly6G y CD206 en biopsias de tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis.
3. Correlacionar la presencia o ausencia de los marcadores asociados a los fenotipos de neutrófilos N1 o N2 con la presencia o ausencia de periodontitis.

V. Materiales y Métodos

V.1 Diseño de estudio:

Observacional, analítico y transversal

V.2 Población de estudio

Se tomó una población de estudio constituida por adultos de ambos géneros entre los 20 a 50 años con periodontitis o sanos y que acudieron a la clínica Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, en el periodo comprendido entre julio del año 2022 y julio del año 2023.

Criterios de inclusión: Hombres y mujeres entre 20 a 50 años de edad, con diagnóstico de periodontitis, que no hayan recibido tratamiento antibiótico ni periodontal al menos 6 meses antes a la aplicación del estudio, no fumadores, y que las mujeres no se encontraran en estado de gestación.

Criterios de exclusión: Pacientes con riesgo cardiovascular, pérdida de dientes no asociada a periodontitis que se utilizaron en el muestreo, consumo de antibióticos por algún cuadro infeccioso antes de la toma de muestra o que tuvieran que recibir tratamiento periodontal de urgencia.

V.3 Examen y diagnóstico periodontal

El muestreo de la población fue por conveniencia y de casos consecutivos. El tamaño muestral se calculó en base a un análisis de la validez externa, obteniéndose un total de 38 personas afectadas de periodontitis y 12 sujetos sanos. A cada sujeto se le realizó un examen odontológico completo, registrando presencia o ausencia de dientes, restauraciones, lesiones de caries, presencia de lesiones periapicales y estado periodontal, realizado por un único operador calibrado. La periodontitis fue considerada cuando existían al menos seis dientes con una profundidad al sondaje de 5 mm o más, con pérdida de inserción ≥ 4 mm y pérdida ósea radiográfica (30% de los sitios involucrados), según los criterios de la clasificación actual de enfermedades periodontales y peri-implantarias (Papapanou y cols., 2018). Basado en el estudio de Van Dyke (Van Dyke, 2020) los pacientes en estado de periodontitis estadio I-II se consideraron como un grupo y estadio III-IV como otro grupo, a partir del estadio III existe una disbiosis.

Pacientes que asistieron a exodoncias programadas de terceros molares o a cirugías de alargamiento coronario se consideraron como donantes sanos.

V.4 Toma de muestras biológicas:

Antes del inicio de cada procedimiento los pacientes firmaron un consentimiento informado encontrado en el Anexo (Pág. 23). De cada paciente se tomaron biopsias de tejido gingival de acuerdo a las necesidades quirúrgicas o terapéuticas. Brevemente, bajo anestesia local, del tejido gingival se tomaron biopsias de cuello gingival de 2mm de ancho, de acuerdo a protocolo utilizado por Dutzan (Dutzan, y cols., 2016). Según el análisis a realizar, las biopsias se sumergieron en RNA safer para preservar el RNA total, o en formalina 10% para realizar el análisis histológico.

V.5 Purificación del RNA total:

La purificación del RNA total de las muestras de tejido gingival y la síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (Díaz-Zúñiga y cols., 2014; Díaz-Zúñiga y cols., 2015^a; Díaz-Zúñiga y cols., 2015^b; Melgar-Rodríguez y cols., 2016). La expresión de los RNA mensajeros de las moléculas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12^a, TNF- α , TGF- β 1, CCL3, CCL5, Arg1, CD206, y Ym1 en los tejidos gingivales se analizó a partir de 50 ng de cDNA mediante qPCR utilizando partidores específicos (Tabla N°1), un *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, EE. UU.) y como indica el fabricante. Para ello, una vez extraído el RNA total y realizada la transcripción reversa, el cDNA se liofilizó y envió al Laboratorio de Biología Periodontal en hielo seco por Fedex.

Molécula	Partidor <i>Forward</i>	Partidor <i>Reverse</i>
IL-1β	<i>ctgtcctgcgtgtgaaaga</i>	<i>ttgggaattttgggatctaca</i>
IL-6	<i>gcccagctatgaactccttct</i>	<i>gaaggcagcaggcaacac</i>
IL-10	<i>tgggggagaacctgaagac</i>	<i>ccttgctctgtttcacagg</i>
IL-12^a	<i>agaaaagacctgtgaacaaaacgact</i>	<i>agatggctcactagatgccagg</i>
TNF-α	<i>cagcctcttctccttctgat</i>	<i>gccagagggtgattagaga</i>
TGF-β1	<i>ggctttcgcttagcgcca</i>	<i>gttggtgtccagggtcggc</i>
CCL3	<i>atgcaggtctccactgctgc</i>	<i>tcaggcactcagctccaggtc</i>
CCL5	<i>ccatgaaggctccgggcac</i>	<i>cctagctcatctccaaagag</i>
Arg1	<i>atggaagagacctcagctac</i>	<i>gctgtctccaagagtggg</i>
CD206	<i>gcccggagtcagatcacaca</i>	<i>agtggctcaaccgatatgacag</i>
Ym1	<i>gggcatacctttatcctgag</i>	<i>ccactgaagtcacatgctc</i>
18S	<i>ctcaacacgggaaacctcac</i>	<i>cgctccaccaactaagaacg</i>

Tabla N^o1. Partidores utilizados para la detección de moléculas. Kochiyama y cols., 2019, Pharoah y cols., 2006, Maresz y cols., 2008, Dutzan y cols., 2012, Diaz-Zuñiga y cols., 2014, Shen y cols., 2017.

V.6 Detección de neutrófilos N1 y N2 mediante inmunofluorescencia

Luego de extraída la biopsia de tejido gingival, las muestras se sumergieron en formalina al 10% v/v. Después de preservarlas, las muestras se embebieron en parafina y se trasladaron al Laboratorio de Biología Periodontal para continuar con su procesamiento. Posteriormente se obtuvieron cortes de 10 μm de grosor en micrótopo y se montaron en portaobjetos. Para las inmunofluorescencias se utilizaron los anticuerpos primarios anti-Ly6G y anti-CD206, seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón o conejo (Alexa Fluor® 488, o Alexa Fluor® 647, Abcam US). Para visualizar los núcleos se utilizó un medio de montaje que contiene DAPI (Abcam, ab104139). La obtención de las imágenes se realizó mediante el Microscopio Confocal C2 Plus Espectral (Nikon, USA) y el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 5.0 (NIH, MD, USA).

V.7 Análisis estadístico

Los datos recolectados de los sujetos de estudio como la profundidad al sondaje, porcentaje de la pérdida de inserción y porcentaje de sangrado al sondaje se expresaron en promedio \pm desviación estándar o porcentajes. Los valores obtenidos de la cuantificación por qPCR se representan en valores promedio de niveles de expresión utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \pm$ desviación estándar, en gráficas de barras o cajas y clavijas, dependiendo si la distribución resulta ser paramétrica o no paramétrica. Para establecer la normalidad de la distribución de los datos se usaron el test de Kolmogorov Smirnov, y el análisis posterior fue mediante ANOVA-Tukey o Kruskal-Wallis-Dunn, dependiendo si la distribución es normal o no. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-value $<0,05$.

VI. Resultados

VI.1 Datos epidemiológicos

En el presente estudio se incluyeron 50 sujetos, con un promedio de edad de $35,8 \pm 3,7$ años (personas sanas), $39,6 \pm 2,8$ años (personas afectadas de periodontitis I o II), y $41,00 \pm 3,8$ años (personas afectadas por periodontitis III o IV). Para el diagnóstico periodontal se utilizaron los parámetros clínicos indicados en el último consenso de la Federación Europea de Periodoncia (Papapanou y cols., 2018) y con las modificaciones sugeridas por Van Dyke (Van Dyke y cols., 2020). Para motivos didácticos en los resultados, las personas se agruparon en periodontitis estadio I-II y periodontitis estadio III-IV. Las características generales de la población se describen en la tabla 1.

	Enfermedad periodontal		
	Sanos (n=12)	Periodontitis estadio I o II (n=14)	Periodontitis estadio III o IV (n=24)
Edad	$35,3 \pm 3,7$	$39,60 \pm 2,8$	$41,00 \pm 3,8$
Sexo (Femenino)	50,0 %	58,0 %	62,5 %
Parámetros periodontales			
Profundidad al sondaje (mm)	$2,70 \pm 0,48$	$2,70 \pm 1,25$	$5,2 \pm 2,04$
Nivel de inserción (mm)	$-0,6 \pm 0,89$	$-1,2. \pm 1,65$	$-6,8 \pm 1,97$
Sangrado (%)	$5,30 \pm 2,90$	$28,80 \pm 5,78$	$41,90 \pm 10,23$

Tabla 1. Características generales de la población de estudio. La tabla representa los valores promedios de la edad, sexo y los índices periodontales utilizados para el diagnóstico periodontal.

VI.2 Cuantificación de los marcadores de neutrófilos N1 mediante PCR

Para determinar la presencia de la población N1 y N2 cuantificamos los niveles de expresión asociados a los marcadores que definen cada fenotipo (Fig. N°1 y N°2). En los pacientes afectados por periodontitis se pudo detectar un incremento de los niveles de expresión de los mediadores pro-inflamatorios CCL3, CCL5, IL-6, IL-12^a, IL-1 β y TNF- α , asociados al fenotipo N1, en comparación al grupo control sano (Fig. N°1). Por otro lado, en los pacientes afectados por periodontitis I-II se detecta un incremento en los niveles de expresión de CCL5, IL-6 y TNF- α en comparación con las personas sanas. No se detectaron diferencias entre las personas afectadas por periodontitis I-II o periodontitis III-IV.

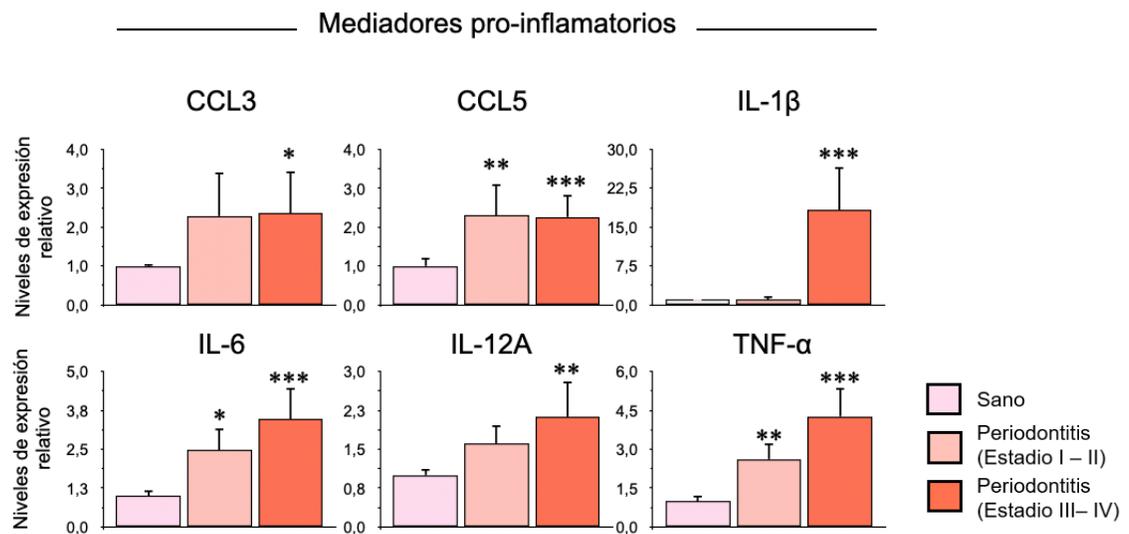


Figura 1. Expresión de marcadores asociados a neutrófilos N1. A partir de biopsias de tejidos periodontales de 50 sujetos “12 sanos; 14 periodontitis I-II y 24 periodontitis III-IV” se cuantificaron los niveles de expresión de CCL3, CCL5, IL-6, IL-12A, TNF- α mediante qPCR. CCL3: Ligando 3 de quimioquina; CCL5: Ligando 5 de quimioquina; IL-6: Interleuquina-6; IL-12A: Interleuquina-12A; TNF- α : Factor de necrosis tumoral. Periodontitis: Estadio III y/o IV; Periodontitis: Estadio I y/o II. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

VI.3 Cuantificación de los marcadores de neutrófilos N2 mediante PCR

En los pacientes afectados tanto por periodontitis I-II como periodontitis III-IV se detectó una disminución en los niveles de expresión de los mediadores inmunomoduladores Arg1, CD206, IL-10, TGF- β 1, Ym1, asociados al fenotipo N2 en comparación con las personas sanas (Fig. N°2). Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de los marcadores entre las personas afectadas por periodontitis I-II o periodontitis III-IV.

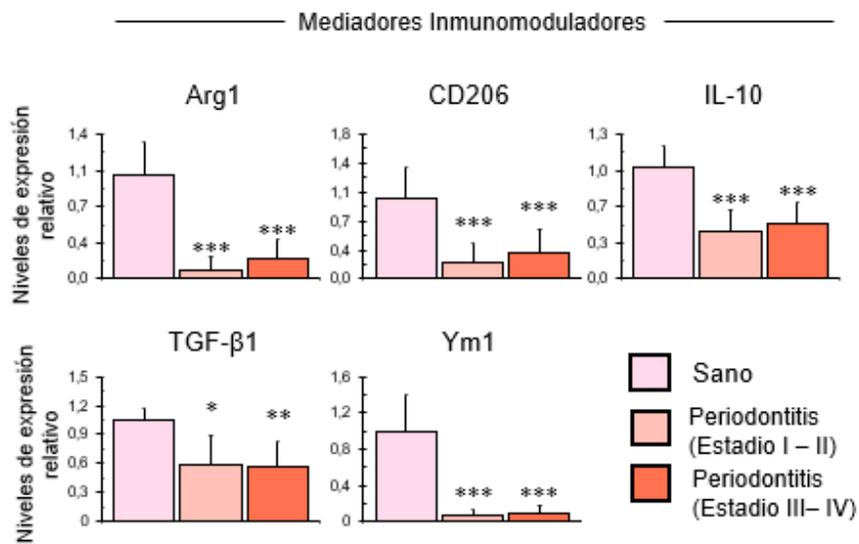


Figura 2. Expresión de marcadores asociados a neutrófilos N2. A partir de biopsias de 50 sujetos “12 sanos; 14 periodontitis I-II y 24 periodontitis III-IV” se cuantificaron los niveles de expresión de Arg1, CD206, IL-10, TGF- β 1, Ym1 mediante qPCR. Arg1: Arginasa 1; CD206: Receptor de manosa tipo C 1; IL-10: Interleucina-10; TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1; Ym1: Proteína 3 similar a la quitinasa. Periodontitis: Estadio III y/o IV; Periodontitis: Estadio I y/o II. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

VI.4 Inmunodetección de neutrófilos N1 y N2.

Hasta la fecha del envío de este trabajo de investigación se había recibido dos biopsias incluidas en parafina proveniente de sujetos sanos y dos de pacientes afectados por periodontitis I-II. En ellas se realizó la inmunofluorescencia para evaluar la presencia de neutrófilos N1 (Ly6G⁺ CD206⁻) o N2 (Ly6G⁻ CD206⁺). Mientras que en los pacientes afectados por periodontitis se detectó la presencia de neutrófilos N1 y la ausencia de N2, en las biopsias de personas sanas no hubo detección de estos fenotipos celulares (Fig. N°3).

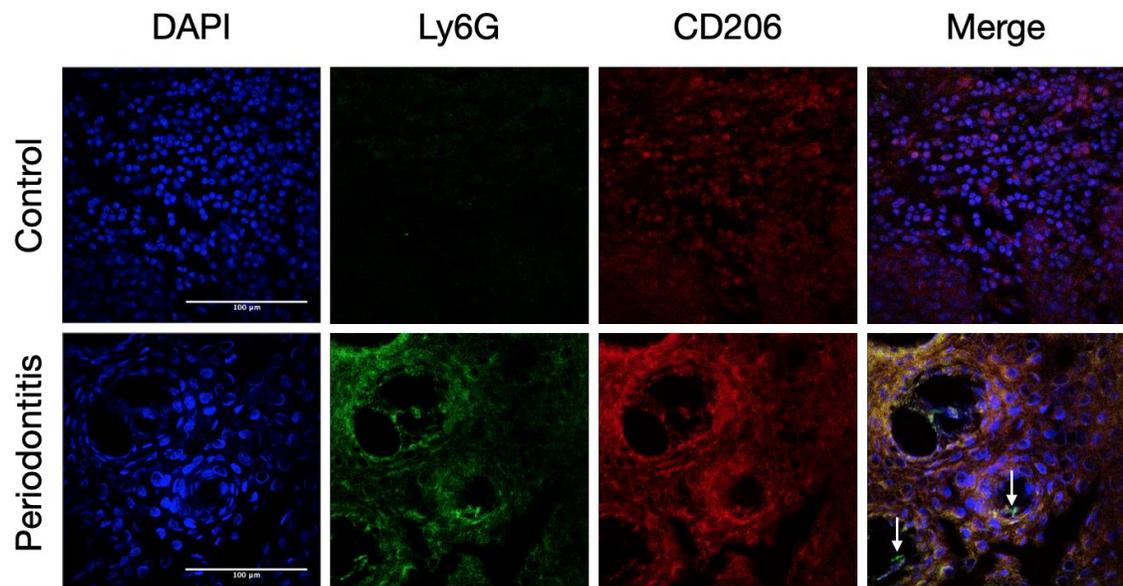


Figura 3. Inmunofluorescencia de biopsias de tejidos periodontales. A partir de biopsias de 2 sujetos sanos y 2 afectados por periodontitis I-II se visualizan los neutrófilos con Ly6G y CD206 para determinar el fenotipo de neutrófilos presente en los tejidos. La flecha de color blanco indica la presencia de neutrófilos positivos para Ly6G (N1).

VII. Discusión

En el presente trabajo observamos que en tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis hay una mayor expresión de marcadores asociados con el fenotipo de neutrófilos N1 y una baja expresión asociada a los fenotipos de neutrófilos N2. Por el contrario, en los tejidos periodontales de personas sanas hay una mayor expresión de neutrófilos N2 y baja de neutrófilos N1. Además, observamos la presencia de neutrófilos N1 en biopsias de tejidos periodontales afectados por periodontitis estadio I-II.

Los neutrófilos poseen un amplio rango de respuestas funcionales que trascienden en su función tradicional de la eliminación de microorganismos. Estas células son receptivas a distintas señales, tienen la capacidad de generar citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios, lo que les permite incidir en el dinamismo de las células circundantes y contribuir a la resolución de la inflamación (Rosales, 2018). Los neutrófilos asociados a tumores (TAN), presentan fenotipos tanto antitumorales (N1) como protumorales (N2). Los neutrófilos N1 se diferencian al estar en presencia de IFN- γ y TNF- α , produciendo las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α , CCL3, CXCL10, la muerte por NETosis y degranulación, cumpliendo un rol antitumoral. Por el contrario, los neutrófilos N2 se diferencian en presencia de IL-10, IL-35, TGF- β 1 y G-CSF, se caracterizan por expresar las citoquinas anti-inflamatorias IL-8, IL-10 y TGF- β 1, favoreciendo el crecimiento tumoral (Sansores y cols., 2022). Además, los neutrófilos y las células TCD8⁺ interactúan entre ellos, donde los neutrófilos N1 activan a las células TCD8⁺ mediante la producción de las quimioquinas CCL3, CXCL9 y CXCL10 y las citoquinas pro-inflamatorias IL-12, TNF- α , GM-CSF y VEGF. Por el contrario, los neutrófilos N2, producen citoquinas inmuno-moduladoras y Arginasa, lo que inhibe las funciones de las células TCD8⁺ (Fridlender y cols., 2009). En el contexto de infarto agudo al miocardio, los neutrófilos N1 liberan mediadores pro-inflamatorios tales como TNF- α , CCL3, IL-1 β y IL-12A, mayores niveles de ROS, mayor actividad enzimas que degradan la matriz, y una mayor respuesta quimiotáctica. En contraste, el fenotipo N2 muestra un efecto protector en eventos cardíacos isquémicos, mostrando una mayor expresión de marcadores anti-inflamatorios IL-10, CD206, Arg1 y Ym1 (Mihaila y cols., 2021).

En pacientes con periodontitis, los neutrófilos al llegar al sitio de la inflamación, se activan y causan la eliminación microbiana mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, una mayor actividad quimiotáctica, fagocítica, y mayor liberación de MPO y ROS y, finalmente, por NETosis que provoca la liberación IL-1 β en los neutrófilos que estén en los alrededores y aumentan la producción de citoquinas como CXCR2, CXCL8, CXCL1, CXCL3 y CXCL3, favoreciendo el infiltrado de neutrófilos que generan la inflamación por degranulación. (Sansores y cols., 2022). Varios estudios evaluaron las citoquinas pro-inflamatorias e inmuno-moduladores tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-35, TNF- α , IFN- γ y TGF- β , demostrando que cuando existe infección bacteriana los neutrófilos N1 tienen una mayor capacidad fagocítica (Sansores y cols., 2022).

En estudios con humanos no existe suficiente evidencia que comprueben la presencia de fenotipos de neutrófilos N1 o N2 en tejido periodontal, sin embargo, hay aproximaciones que afirman el incremento de una respuesta pro-inflamatoria en pacientes con periodontitis, lo que no significa que estos fenotipos de neutrófilos se encuentran presentes en los tejidos periodontales y tampoco es posible reconocer su función, por tal razón, se necesitan estudios *in vitro* y experimentales donde determinen las funciones de ambos fenotipos de neutrófilos en la periodontitis (Sansores y cols., 2022).

Cuando se produce un aumento de detección del fenotipo de neutrófilo N1 en los tejidos periodontales se asocia a un perfil pro-inflamatorio, lo que genera un aumento de la respuesta inflamatoria local, desencadenando la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α , y ROS. Por otro lado, el fenotipo de neutrófilos N2 se asocia a un perfil antiinflamatorio participando así de la regeneración tisular (Sansores y cols., 2022).

En nuestros resultados existen mayores niveles de marcadores pro-inflamatorios y menores inmuno-moduladores en las periodontitis estadio I-II y III-IV, en comparación con los tejidos derivados de sujetos sanos. Estos datos sugieren que el fenotipo de neutrófilo N1 predomina en periodontitis I-II y III-IV, por otro lado, el fenotipo neutrófilo N2 predomina en pacientes sanos.

La citoquina CCL5, producida por linfocitos T activados, es quimioatrayente para diversos tipos de células inmunes. La presencia de CCL5 en el líquido crevicular gingival se vincula estrechamente con la periodontitis, existe un aumento

significativo en la concentración de CCL5 en pacientes con periodontitis en comparación con individuos sanos. (Barczak y cols.,2023). La presencia de ciertas bacterias como *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* induce tanto la expresión y producción de CCL5, como de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF α , IL-6 y CCL3. Asimismo, la infección por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está asociada a un aumento en la expresión de CCL3 y CCL5, indicando que el conjunto de estas citoquinas podría estar asociada en la patogénesis de la periodontitis (Barczak y cols.,2023).

En los tejidos periodontales, los neutrófilos se identifican con marcadores de superficie. En las últimas décadas, los métodos como la inmunofluorescencia y la citometría de flujo han facilitado la identificación e investigación de los marcadores de superficie para identificar los subconjuntos de neutrófilos (Hirschfeld, 2020). En términos generales, la polarización de neutrófilos N1 se definieron como Ly-6G⁺ CD206⁻ o Ly-6G⁺ Ym1⁻ y los neutrófilos N2 como Ly-6G⁺ CD206⁺ o Ly-6G⁺ Ym1⁺. En efecto, la polarización de neutrófilos se ha investigado actualmente en modelos de animales, como en cáncer, infecciones bacterianas, accidentes cerebrovasculares e infartos al miocardio (Ma y cols., 2016).

Con respecto a las implicancias clínicas que podríamos analizar del estudio, estas pueden ser con objetivos terapéuticos, ya que se observa un incremento en los mediadores pro-inflamatorios en los estadios de periodontitis I-II y III-IV. Esto permitiría explorar estrategias terapéuticas para disminuir los marcadores pro-inflamatorios del fenotipo de neutrófilos N1, e inducir un aumento de los mediadores inmuno-moduladores para que pueda incrementar el número de neutrófilos N2 que infiltren los tejidos dañados para mejorar los parámetros clínicos de los pacientes (Sansores y cols., 2022).

En relación a las limitaciones que se podrían considerar dentro del trabajo, es que al ser un tipo de estudio transversal podemos solo medir los niveles de mediadores en un punto específico del tiempo y no nos permite detallar la progresión de la enfermedad o la variación de los marcadores pro-inflamatorios e inmuno-moduladores en el tiempo. Además, no podemos determinar causalidad, independiente de que podemos observar la relación entre los niveles de los biomarcadores y la presencia de la periodontitis. Por otro lado, el tamaño de la población estudiada es relativamente pequeña, limita la capacidad de generalizar el

estudio en una población más grande. Por último, si logramos disminuir los niveles de mediadores pro-inflamatorios asociados a fenotipo de neutrófilos N1 y aumentar los mediadores inmuno-moduladores asociados a fenotipos de neutrófilos N2 mejorará la resolución de la respuesta inflamatoria en pacientes con periodontitis promoviendo así la regeneración tisular.

VIII. Conclusión

Las personas afectadas por periodontitis presentan mayores niveles de marcadores asociados a los fenotipos N1, lo que sugiere una mayor frecuencia de detección en comparación con los sujetos sanos.

IX. Referencias

- Barczak, K., Drożdżik, A., Bosiacki, M., Łagocka, R., Cenariu, D y cols. (2023). CCL5's Role in Periodontal Disease: A Narrative Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(24), 17332. <https://doi.org/10.3390/ijms24241733217332>.
- Cai, W., Liu, S., Hu, M., Huang, F., Zhu, Q y cols. (2019). Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke. *Translational Stroke Research*, 11(1), 108-121. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00694-y>
- Carbone, F., Bonaventura, A., y Montecucco, F. (2020). Neutrophil-Related Oxidants Drive Heart and Brain Remodeling After Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers In Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01587>
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A y cols. (2015). T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *Journal Of Periodontal Research*, 50(6), 824-835. <https://doi.org/10.1111/jre.12270>
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A y cols. (2014). Variability of the Dendritic Cell Response Triggered by Different Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* Is Toll-Like Receptor 2 (TLR2) or TLR4 Dependent. *Journal Of Periodontology*, 86(1), 108-119. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140326>
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M y cols. (2013). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal Of Clinical Periodontology*, 41(3), 242-251. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12205>
- Dutzan, N., Konkel, J., Greenwell-Wild, T., y Moutsopoulos, N. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunology*, 9(5), 1163-1172. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.13>
- Dutzan, N., Vernal, R., Vaque, J. P., García-Sesnich, J., Hernandez, M y cols. (2011). Interleukin-21 Expression and Its Association With Proinflammatory Cytokines in Untreated Chronic Periodontitis Patients. *Journal Of Periodontology*, 83(7), 948-954. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110482>

- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G y cols. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- Hajishengallis, E., y Hajishengallis, G. (2014). Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults. *Journal of Dental Research*, 93(3), 231–237. <https://doi.org/10.1177/0022034513507956>
- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6), 248–257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>
- Hirschfeld, J. (2020). Neutrophil Subsets in Periodontal Health and Disease: A Mini Review. *Frontiers In Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03001>
- Kochiyama, T., Li, X., Nakayama, H., Kage, M., Yamane, Y y cols. (2019). Effect of Propofol on the Production of Inflammatory Cytokines by Human Polarized Macrophages. *Mediators Of Inflammation*, 2019, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/1919538>
- Könönen, E., Gursoy, M., y Gursoy, U. (2019). Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *Journal Of Clinical Medicine*, 8(8), 1135. <https://doi.org/10.3390/jcm8081135>
- Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R. P., Cannon, P. L., Flynn, E. R y cols. (2016). Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 110(1), 51-61. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw024>
- Maresz, K., Ponomarev, E. D., Barteneva, N., Tan, Y., Mann, M. K. y Dittel, B. N. (2008). IL- 13 induces the expression of the alternative activation marker Ym1 in a subset of testicular macrophages. *Journal of Reproductive Immunology*, 78(2), 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2008.01.001>.
- Matsuo, K., Lin, A., Procter, J. L., Clement, L., y Stroncek, D. (2000). Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion*, 40(6), 654–662. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40060654.x>
- Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P y cols. (2015). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular Oral Microbiology*, 31(2), 162-174. <https://doi.org/10.1111/omi.12112>

- Mihaila, A. C., Ciortan, L., Macarie, R. D., Vadana, M., Cecoltan, S y cols. (2021). Transcriptional Profiling and Functional Analysis of N1/N2 Neutrophils Reveal an Immunomodulatory Effect of S100A9-Blockade on the Pro-Inflammatory N1 Subpopulation. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708770>
- Ohms, M., Möller, S., y Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00532>.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal Of Periodontology*, 89(S1). <https://doi.org/10.1002/jper.17-0721>
- Pharoah, D., Varsani, H., Tatham, R., Newton, K., De Jager, W y cols. (2006). Expression of the inflammatory chemokines CCL5, production by an atypical subset of CD8+ T cells. *Arthritis Research & Therapy*, 8(2), R50. <https://doi.org/10.1186/ar1913>.
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rudin, A. D., Amirbeagi, F., Davidsson, L., Khamzeh, A., Thorbert-Mros, S y cols. (2020). The neutrophil subset defined by CD177 expression is preferentially recruited to gingival crevicular fluid in periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 109, 349–362.
- Sansores-España, L. D., Melgar-Rodríguez, S., Vernal, R., Carrillo-Ávila, B. A., Martínez-Aguilar, V. M y cols. (2022). Neutrophil N1 and N2 subsets and their possible association with periodontitis: A scoping review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12068. <https://doi.org/10.3390/ijms232012068>
- Shen, T., Tsai, C., Chang, W., Wang, S., Chao, C y cols. (2017). Association of Interleukin-12A rs568408 with Susceptibility to Asthma in Taiwan. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03523-0>
- Taniguchi, K., Kobayashi, M., Harada, H., Hiraoka, A., Tanihiro, M y cols. (2002). Human neutrophil antigen-2a expression on neutrophils from healthy adults in western Japan. *Transfusion*, 42(5), 651–657. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00092.x>

Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., & Reynolds, E. C. (2020). The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Frontiers In Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00511>

Wang, X., Qiu, L., Li, Z., Wang, X., & Yi, H. (2018). Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Frontiers In Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02456>

X.Anexo



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, México, a 11 de enero de 2023

DICTAMEN			
OFICIAL	FECHA: 11/01/2023	NÚMERO (ID): CEI-15-2022	PROTOCOLO: INVESTIGACIÓN
TÍTULO:	Frecuencia de detección de fenotipos de neutrófilos N1 y N2 en tejidos periodontales afectados de periodontitis marginal o apical.		
RESPONSABLES:	Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar.		
Adscripción donde se realizará el estudio:	Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán		
Teléfonos:		Correo-e:	
OBSERVACIONES ACERCA DEL PROTOCOLO			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Este proyecto fue evaluado de forma colegiada y con apego a las normas y leyes vigentes internacionales y de nuestro país. 2. Cumple con los requisitos éticos y la metodología para llevar a cabo la investigación. 3. Indicar como cómo se seleccionará a los participantes. 4. Se recomienda que en la carta de consentimiento informado se aclare en un lenguaje coloquial cuál será el beneficio del estudio y se especifique mejor cómo se manejará la confidencialidad de los datos. 			
DICTAMEN:	APROBADO CON MODIFICACIONES MENORES		

ATENTAMENTE

DRA. NORMA PAVÍA RUZ

VOCAL PRESIDENTE

DR. ÁNGEL LENDECHY GRAJALES

VOCAL SECRETARIO